

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»**

На правах рукописи

ЗАМАЛЕЕВА АЛСУ ИЛЬГИЗОВНА

**ИММОБИЛИЗАЦИЯ НАНОМАТЕРИАЛОВ НА ПОВЕРХНОСТИ
ЖИВЫХ КЛЕТОК ЭУКАРИОТ И ПРОКАРИОТ**

03.01.04 – Биохимия

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань - 2010

Работа выполнена на кафедре биохимии ФГАОУ ВПО "Казанский (Приволжский) федеральный университет"

Научный руководитель: доктор биологических наук,
профессор Ишмухаметова Диляра Галимовна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Шарипова Маргарита Рашидовна

кандидат биологических наук, врач высшей
категории Саттарова Лилия Ирековна

Ведущая организация: Казанский институт биохимии и биофизики
Казанского научного центра Российской
академии наук (г. Казань)

Защита диссертации состоится 30 сентября 2010 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420008, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, Казанский (Приволжский) федеральный университет, аудитория № 211.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете.

Автореферат разослан "___" августа 2010 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
доктор биологических наук



З.И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В течение последних лет функциональные наноструктуры привлекают все больший интерес ученых благодаря уникальным свойствам и возможности их широкого применения в различных областях: электронике (Murray et al., 2000; Lee et al., 2009), оптике (Schmid et al., 1998) и биосенсорах. (Bottomley et al., 2004; Mani et al., 2009). Применение наноматериалов в сочетании с биологическими макромолекулами позволяет создавать новые методы диагностики заболеваний (Gao et al., 2004.; Park et al., 2009) и разрабатывать новые биологически совместимые материалы с необычными свойствами (Lvov et al., 2008; Veerabadran et al., 2009). Кроме того, многочисленные исследования были посвящены созданию и изучению гибридных систем, построенных с применением наноматериалов на основе биологических клеток. Эти работы, в основном, сфокусированы на создании микро- и наноконтейнеров для направленной доставки лекарств (Möhwald 2000), микроэлектронных устройств (Berry et al., 2004) и контролируемой иммобилизации клеток (Krol et al., 2005).

Наноматериалы рассматриваются как перспективные модификаторы поверхностных структур клеток. Например, широко используются полимеры, микрочастицы, наночастицы и их всевозможные комбинации (Dahne et al., 2004). В ряде работ описывается иммобилизация наночастиц на поверхности различных клеток. В частности, было показано нанесение золотых наночастиц на поверхность клеток *E. coli* с целью создания электрических микроконтактов (Berry et al., 2004). Получены и охарактеризованы комплексы никелевых наночастиц и клеток бактерий для создания на их основе магнитных микроустройств (Jing et al., 2007). Поверхность клеток дрожжей *Kluveromyces fragilis* была модифицирована магнитными наночастицами, в результате чего были получены эффективные сорбенты на основе магнетизированных клеток (Safarik et al., 2007). Однако в указанных работах клетка не рассматривается как живая функционирующая система, хотя очевидно, что находящиеся в непосредственной близости от поверхности живой клетки наноматериалы могут оказать существенное влияние на функционирование биохимического аппарата клетки и межклеточные взаимодействия. Таким образом, изучение взаимодействия живых клеток с наноматериалами представляет особый интерес, и обусловлено это тем, что гибридные системы, полученные на основе наноматериалов и живых клеток, могут быть использованы для выявления токсичных свойств наноматериалов, для направленного изменения свойств клеток, регуляции их физиологической активности, визуализации клеточных органелл и высокоточной спектральной идентификации живых клеток, основанной на различиях в биохимическом составе их поверхностных структур. В связи с этим представляется весьма актуальным разработать такие методы иммобилизации наноматериалов на поверхности клеток, которые позволяют сохранить их физиологическую активность.

Целью настоящей работы явилась иммобилизация наноматериалов на поверхности живых клеток и характеристика модифицированных клеток.

Были поставлены следующие задачи:

1. Разработать метод иммобилизации сферических наночастиц благородных металлов, магнитных наночастиц, а также углеродных нанотрубок на поверхности клеток прокариот и эукариот с использованием послойного нанесения биосовместимых синтетических и биогенных полиэлектролитов.
2. Охарактеризовать распределение наноматериалов на клеточных стенках и цитоплазматических мембранах клеток.
3. Исследовать влияние иммобилизованных наноматериалов на жизнеспособность модифицированных клеток.
4. Оценить возможность использования метода иммобилизации наноматериалов на клеточных стенках и цитоплазматических мембранах живых клеток для модификации клеток с целью их идентификации спектроскопическими методами, а также

использования модифицированных клеток в электрохимических биосенсорах и микроаналитических устройствах.

Научная новизна. В работе впервые описан универсальный метод иммобилизации наноматериалов на поверхности живых клеток путем включения наноструктур в состав многослойных полимерных и биополимерных полиэлектролитных пленок, что позволило привести их в контакт с клетками в непосредственной близости от поверхностных клеточных структур без проникновения наноструктур в цитоплазму. Показано, что формирование наноструктурированных пленок на поверхности клеток разработанным нами методом не влияет на жизнеспособность модифицированных клеток. Впервые были получены и охарактеризованы гибридные системы, состоящие из живых клеток и наноматериалов различной природы.

Практическая значимость. Разработанный метод иммобилизации наночастиц благородных металлов на поверхности живых клеток может быть использован для изучения биохимического состава клеток с применением поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии. Модифицированные углеродными нанотрубками клетки могут быть использованы в качестве чувствительного элемента электрохимических биосенсоров для определения цитотоксичных веществ. Клетки, модифицированные полиаллиламин гидрохлорид-стабилизированными магнитными наночастицами, могут найти применение в микроканальных устройствах, так как после модификации возникает возможность пространственного манипулирования ими с помощью внешнего магнитного поля.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработанный универсальный метод модификации живых клеток позволяет эффективно иммобилизовать широкий спектр наноматериалов на поверхности клеток эукариот и прокариот.
2. Клетки, модифицированные наноматериалами, сохраняют физиологическую активность, что позволяет использовать их в качестве структурных элементов биоэлектронных устройств.

Апробация работы. Основные результаты исследований докладывались на ежегодных итоговых научных конференциях Казанского государственного университета (2008-2010 гг.), IV Международной конференции «Современные достижения бионаноскопии» (Москва, 2008), II Международной научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» (Казань, 2008), XII Международной научной молодежной школе «Когерентная оптика и оптическая спектроскопия» (Казань, 2008), II Saint-Petersburg international conference of NanoBioTechnologies «NanoBio'08» (С.-Петербург, 2008), всероссийской школе-семинаре для студентов, аспирантов и молодых ученых «Нанотехнологии: проблемы и перспективы» (Белгород, 2008), XIII всероссийской конференции «Структура и динамика молекулярных систем (Казань, 2009), XIII международной конференции молодых ученых, студентов и аспирантов «Синтез, исследование свойств, модификация и переработка высокомолекулярных соединений – V Кирпичниковские чтения» (Казань, 2009), XIII европейском симпозиуме студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз 2009» (Казань, 2009), 14th UKPCF Annual Meeting «UK Polymer Colloids Forum» (United Kingdom, 2009). Работа была поддержана молодежным грантом Академии Наук Республики Татарстан (№ 14-15/2009(Г)) и Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере по программе «Участник Молодежного Научно-Инновационного Конкурса» («УМНИК»)(№ 19-У-08-6).

Публикации по теме диссертации. Основное содержание работы отражено в двадцати научных публикациях [1-20], в том числе в пяти статьях, опубликованных в ведущих международных журналах [1, 2, 4, 6, 7], в двух статьях в российских журналах [3, 5] и в патенте РФ [8]. Работы [1 – 7] удовлетворяют требованиям ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 176 страницах машинописного текста, включает 76 рисунков и 3 таблицы. Библиография включает 203 источника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследования были конидии микромицетов *Trichoderma asperellum*, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, бактерии *Escherichia coli* и *Staphylococcus cohnii*, водоросли *Chlorella pyrenoidosa* и лимфоциты крови крупного рогатого скота (КРС).

Методы исследования:

Методы синтеза наноматериалов: в работе были использованы методы синтеза наноструктур: золотых наночастиц (AuНЧ) по методу Lee (Lee et al, 1982) и серебряных наночастиц (AgНЧ) по методу Handley (Handley, 1989); оксидных магнитных наночастиц (МНЧ) по методике, описанной ранее Фахруллиным (Fakhrullin, et al., 2010) с некоторыми модификациями. Многостенные углеродные нанотрубки (УНТ) были предварительно солюбилизованы.

Метод иммобилизации наноматериалов на поверхности клеток включал несколько этапов. На начальном этапе проводили подготовку клеток, для этого к клеткам добавляли водный раствор NaCl соответствующей для каждого объекта концентрации, встряхивали и центрифугировали. Далее клетки ресуспендировали в растворе NaCl. Нанесение полиэлектролитных пленок осуществляли по методу послойного нанесения (Krol et al., 2003): в раствор поликатиона полиаллиламин гидрохлорида (ПАН) вносили суспензию клеток, затем инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут с последующим центрифугированием для удаления избытка полиэлектролита и промывали в воде. Затем аналогично наносили полианион полистирол сульфонат (PSS). Таким образом, на поверхность клеток можно нанести необходимое количество полимерных нанопленок. Для иммобилизации наноструктур на поверхности клеток, в суспензию, содержащую наноматериалы (AuНЧ, AgНЧ, МНЧ и УНТ), вносили определенный объем суспензии клеток, модифицированных ПАН и PSS, и встряхивали. Далее клетки инкубировали и отмывали от несвязавшихся наночастиц. На последних этапах клетки, модифицированные пленками ПАН, PSS и наноструктурами, обрабатывали ПАН и PSS таким образом, чтобы последним слоем был PSS (для уменьшения агрегации клеток).

Для оценки формирования многослойных полиэлектролитных пленок и наноструктур были применены методы кварцевого наногравиметрического анализа (QCM 200 Stanford Research Systems (США)) и методы динамического светорассеивания (измерение ζ -потенциала) (Malvern Zetasizer 3000 HS (Великобритания)).

Характеристику модифицированных клеток и синтезированных наноматериалов проводили с использованием методов оптической микроскопии (Carl Zeiss Jenamed, Leica DM 1000 (Германия)), флуоресцентной микроскопии (Carl Zeiss AxioScope A1 (Германия), Olympus BX 51 (Япония), Leica DMIL (Германия)), сканирующей электронной микроскопии (Carl Zeiss EVO 40, Carl Zeiss EVO 50XVP (Германия)), энергодисперсионной спектроскопии (INCA 350 EDX (Германия)), просвечивающей электронной микроскопии (Jeol 1200 EX (Япония)), атомно-силовой микроскопии (NTEGRA Prima (Россия), Park Systems XE-100 (Южная Корея), поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии (спектроскопии комбинационного рассеивания) (рамановский микроспектрометр Renishaw InVia Reflex Raman (Великобритания) и методом циклической вольтамперометрии (анализатор Ecotest-VA (Россия)).

Жизнеспособность модифицированных клеток определяли методами витального окрашивания клеток красителем трипановым синим и регистрации биохимической активности с использованием диацетата флуоресцеина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез и характеристика наноматериалов

На первом этапе работы мы осуществляли синтез (AuНЧ, AgНЧ, МНЧ) или подготовку (многостенные УНТ) наноматериалов и их характеристику с использованием спектроскопических и микроскопических методов. В таблице 1 приведены некоторые параметры синтезированных наноструктур.

Таблица 1. Параметры (размер и ζ -потенциал) синтезированных наноматериалов

наноструктуры	средний диаметр наноструктур, нм	значение ζ -потенциала, мВ
AuНЧ	20±4	-34±2
AgНЧ	40±7	-38±2
МНЧ	15±3	+48±5
УНТ	d~10-30, l ~0,1-0,5 мкм	-35±3*

* - по данным Wang (Wang et al., 2008)

Алгоритм иммобилизации наноматериалов на поверхности клеток

В качестве исследуемых объектов были выбраны представители разных царств живой природы. Учитывая, что поверхностные структуры у клеток, принадлежащих к разным типам организмов, различаются как по биохимическому составу и композиции биополимеров, так и по физическим свойствам (толщина, поверхностный заряд и т.д.), нами были выбраны клетки некоторых, на наш взгляд, типичных представителей царств животных, растений, грибов и бактерий, а именно: лимфоциты крови млекопитающих (КРС), клетки растений (одноклеточные водоросли *C. pyrenoidosa*), клетки грибов (дрожжи *S. cerevisiae* и конидии *T. asperellum*) и прокариот - клетки грамотрицательных (*E. coli*) и грамположительных бактерий (*S. cohnii*). Размеры клеток варьируют в пределах ~ 4 - 8 мкм и обладают шаровидной или палочкообразной формой, что позволяет оптимизировать гидродинамические условия обработки клеток.

За основу метода иммобилизации наноматериалов на поверхности клеток была взята техника послойного нанесения противоположно заряженных полиэлектролитов (Krol et al., 2003). Основной и ранее не описанной особенностью показанного в данной работе метода стало нанесение наноматериалов совместно с нанопленками из синтетических и биологических макромолекул. Таким образом, нанопленки служили в качестве макромолекулярного носителя, обеспечивающего как фиксацию наноматериалов на поверхности клеток, так и защиту клеток от потенциально токсичного воздействия наноматериалов. Непосредственная модификация клеток заключалась в том, что поверхность исследуемых клеток покрывали полиэлектролитами (например, PАН и PSS) и различными наноструктурами (AuНЧ, AgНЧ, МНЧ и УНТ).

Предварительно нами было изучено формирование многослойных пленок на планарной поверхности с применением метода кварцевого наногравиметрического анализа. Было установлено оптимальное время адсорбции полиэлектролитов на противоположно заряженные поверхности, которое составило 15 минут.

Техника послойного нанесения полиэлектролитов основана на электростатическом взаимодействии наносимых слоев, поэтому в работе были определены значения ζ -потенциала исследуемых объектов и используемых материалов в воде.

Принципиальная схема метода иммобилизации наноматериалов на поверхности клеток показана на схеме (Рис.1). Так как поверхность клеток заряжена отрицательно, при иммобилизации наноматериалов суспензию клеток первоначально помещали в избыток положительно заряженного электролита.

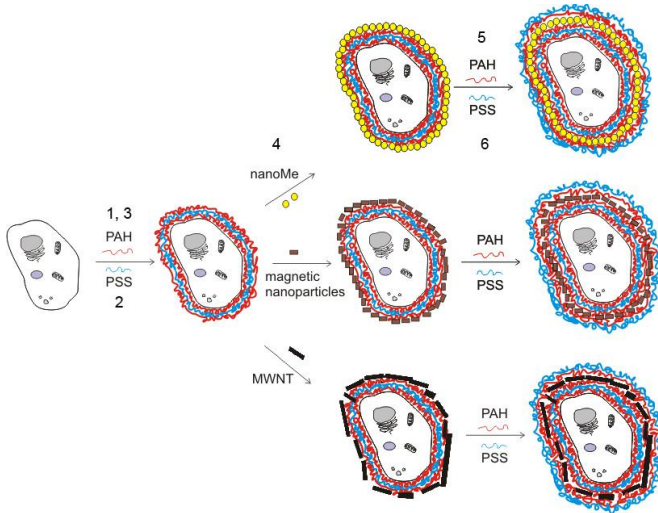


Рис. 1. Схематическое изображение процесса иммобилизации наноматериалов на поверхности живых клеток. Этапы: 1, 2, 3, 5, 6-Нанесение полиэлектролитов PAH/PSS. 4. Иммобилизация наноструктур на поверхности клеток

После промывки клетки помещали в насыщенный раствор отрицательно заряженного полиэлектролита PSS, затем снова инкубировали в растворе PAH. Далее на подготовленную поверхность клеток наносили наноструктуры и закрепляли их бислоемной пленкой PAH/PSS. Таким образом, при иммобилизации наноматериалов на поверхности клеток структура покрытий была следующей: PAH/PSS/PAH/AuНЧ/PAH/PSS, PAH/PSS/PAH/AgНЧ/PAH/PSS, PAH/PSS/PAH/MНЧ/PAH/PSS и PAH/PSS/PAH/УНТ/PAH/PSS. Далее в работе будут приводиться сокращенные обозначения данных покрытий: PAH/PSS-AuНЧ, PAH/PSS-AgНЧ, PAH/PSS-MНЧ, PAH/PSS-УНТ соответственно.

Характеристика клеток, модифицированных наноматериалами

Клетки дрожжей *S. cerevisiae* и конидии *T. asperellum*, модифицированные полиэлектролитными пленками и наночастицами благородных металлов

На начальном этапе работы была оценена возможность применения биологических полимеров ДНК и БСА и синтетических полимеров PAH и PSS для иммобилизации наноматериалов на поверхности клеток *S. cerevisiae* и *T. asperellum*. На оптических микрофотографиях (Рис.2) видны агрегаты металлических НЧ в виде темных пятен на модифицированных клетках дрожжей, которые образуются при присоединении отрицательно заряженных НЧ к слою положительно заряженного полимера в результате частичной компенсации заряда. Особенно четко проявляется различие на оптических микрофотографиях конидий: клетки, модифицированные пленками и наночастицами, приобретают темную окраску из-за большого количества агрегатов наночастиц, иммобилизованных на поверхности клеток.

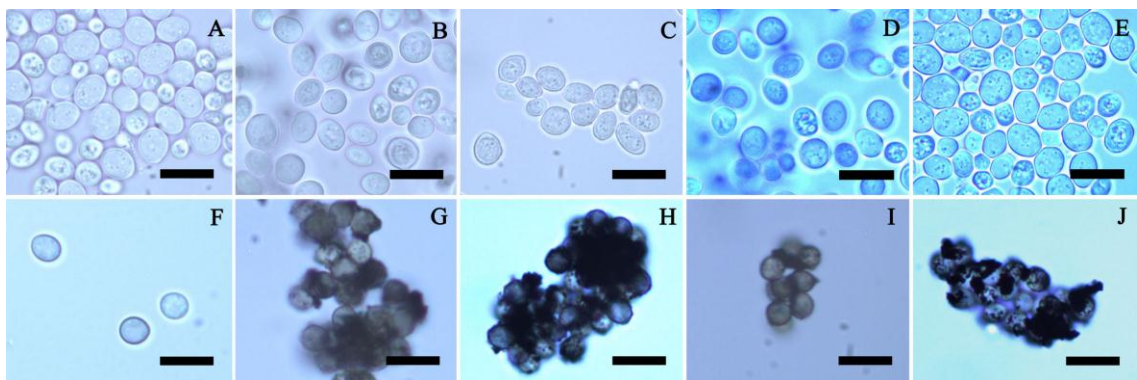


Рис.2. Типичные оптические микрофотографии дрожжей *S. cerevisiae* (A-E) и конидий *T. asperellum* (F-J): интактные клетки (A,F); модифицированные PAH/PSS-AuНЧ (B,G), PAH/PSS-AgНЧ (C,H), ДНК/БСА-AuНЧ (D,I), ДНК/БСА-AgНЧ. Шкала размера – 10 мкм

Таким образом, даже оптическая микроскопия позволяет оценить эффективность модификации поверхности клеток.

Следующим этапом характеристики модифицированных клеток стала сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), которая позволяет изучить модифицированную поверхность клеток с высоким разрешением и визуализировать наноструктуры, иммобилизованные на поверхности клеток.

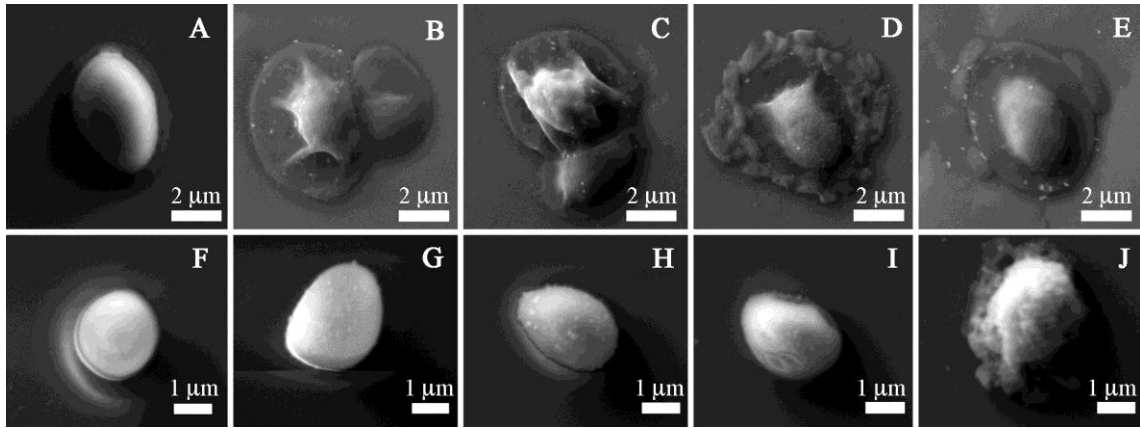


Рис.3. Типичные СЭМ изображения дрожжей *S. cerevisiae* (A-E) и конидий *T. asperellum* (F-J): интактные клетки (A,F); модифицированные PAN/PSS-AuНЧ (B,G), PAN/PSS-AgНЧ (C,H), ДНК/БСА-AuНЧ (D,I), ДНК/БСА-AgНЧ (J)

На электронных микрофотографиях дрожжей и конидий, модифицированных полиэлектролитными пленками и НЧ, четко видны агрегаты металлических НЧ, включенные в полимерные пленки и изменяющие однородную, ровную поверхность клеток (Рис. 3). Электронные изображения показывают неоднородный характер многослойных пленок в случае использования природных полимеров ДНК и БСА, что может быть связано с большей молекулярной массой и пространственным строением комплексов биополимеров по сравнению с синтетическими. Таким образом, можно предположить, что химическая структура полиэлектролитов оказывает влияние на процесс включения наночастиц в структуру пленок.

Для исследования распределения наночастиц на поверхности модифицированных клеток была применена просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). Данная техника позволяет изучить тонкие срезы клеток и охарактеризовать распределение наночастиц не только на поверхности клеточных стенок и мембран, но и в цитоплазме. ПЭМ показала присоединение как единичных наночастиц, так и их агрегатов к клеточной стенке (Рис. 4). Как видно на рисунке, НЧ иммобилизованы на поверхности клеточной стенки, при этом не наблюдается проникновения НЧ в цитоплазму. Мы предполагаем, что полиэлектролитные пленки предотвращают проникновение НЧ и способствуют сохранению жизнеспособности клеток дрожжей в присутствии потенциально цитотоксичных НЧ благородных металлов.

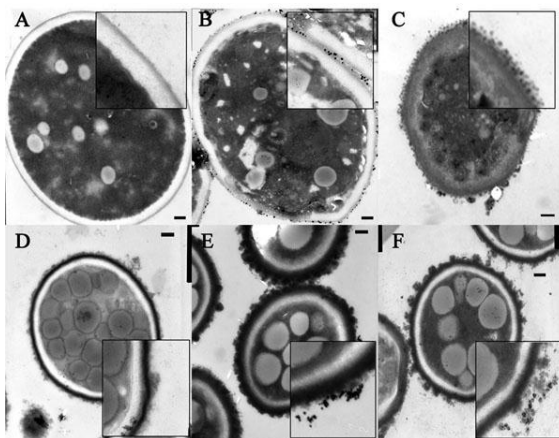


Рис.4. Типичные ПЭМ изображения дрожжей *S. cerevisiae* (A-C) и конидий *T. asperellum* (D-F): интактные клетки (A,D); модифицированные PAN/PSS-AuНЧ (B,E), PAN/PSS-AgНЧ (C,F)

Таким образом, с использованием электронной микроскопии были определены размеры многослойных пленок, плотность и характер распределения наноструктур на поверхности модифицированных клеток дрожжей и конидий. Установлено, что толщина образованных пленок была соизмерима с размерами наноструктур и составила ~ 25 нм для AuНЧ и ~ 50 нм для AgНЧ содержащих нанопленок.

На следующем этапе работы была детально изучена топография поверхности модифицированных клеток с использованием метода атомно-силовой микроскопии (АСМ).

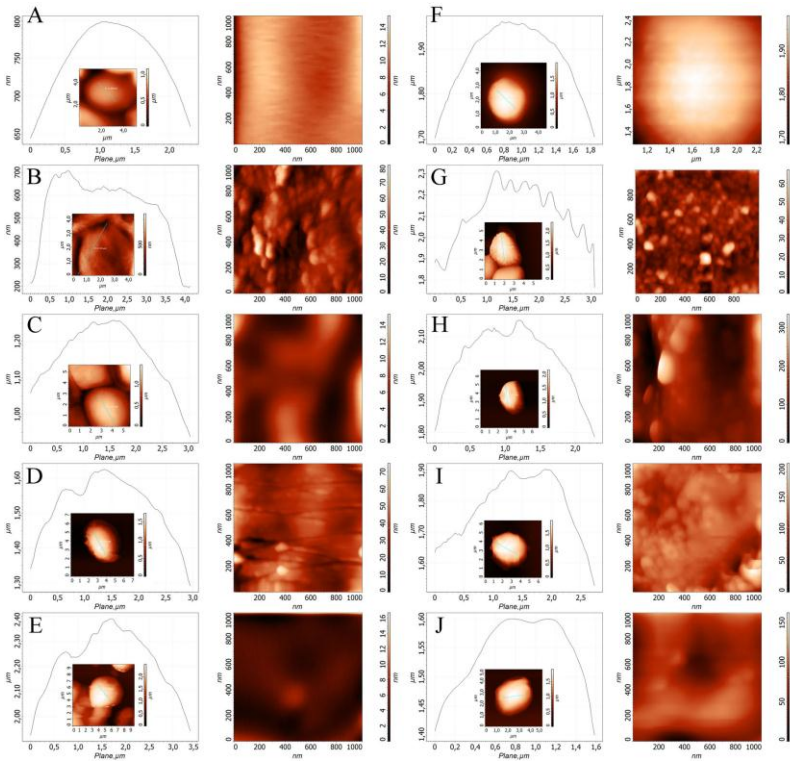


Рис.5. Типичные АСМ изображения дрожжей *S. cerevisiae* (A-E) и конидий *T. asperellum* (F-J): интактные клетки (A,F); модифицированные PAN/PSS-AuНЧ (B,G), PAN/PSS-AgНЧ (C,H), ДНК/БСА-AuНЧ (D,I), ДНК/БСА-AgНЧ. Слева - профиль клетки с изображением продольного сечения клетки, справа-топография поверхности

На Рис. 5 показаны изображения поверхности модифицированных наноматериалами клеточных стенок, полученных при помощи АСМ. Для всестороннего анализа модифицированных клеток были использованы профиль среза клетки и топография поверхности интактных и модифицированных дрожжей.

Видно, что профиль интактных клеток относительно гладкий, поверхность ровная и однородная. После модификации клеток на поверхности четко видны AuНЧ и AgНЧ. Независимо от типа применяемых наночастиц, профиль клеток меняется, приобретает зигзагообразный вид. Поверхность же становится неоднородной, более шероховатой. Аналогичные результаты были показаны и для модифицированных конидий *T.asperellum*. После иммобилизации наноматериалов значительно увеличивается поверхностная площадь модифицированных клеток. Можно провести параллели между клетками дрожжей и конидий, обработанных одинаковыми полимерами и НЧ. Очевидно, структура топографии поверхности клеток, модифицированных разными методами, соответствуют друг другу.

В качестве показателя, характеризующего изменение топографии модифицированной поверхности, обусловленного нанесением нанопленок и наночастиц, был использован параметр среднеквадратичной шероховатости (Sq) поверхности клеток. Данные приведены в Таблице 2.

Таблица 2. Значения параметра среднеквадратичной шероховатости поверхности клеток в зависимости от состава пленочных покрытий

клетка	значения параметра шероховатости (Sq) поверхности клеток, nm				
	интактная	PAN/PSS-AuНЧ	PAN/PSS-AgНЧ	ДНК/БСА-AuНЧ	ДНК/БСА-AgНЧ
<i>S. cerevisiae</i>	1,6 ± 0,1	11,5 ± 0,3	2,3 ± 0,1	2,3 ± 0,2	22,6 ± 0,6
<i>T. asperellum</i>	3,3 ± 0,2	7,6 ± 0,2	20,7 ± 0,4	17,5 ± 0,3	17,9 ± 0,3

Таким образом, видно, что после иммобилизации полиэлектролитных пленок и металлических НЧ шероховатость поверхности клеток увеличивается во всех случаях. Причем, для конидий *T. asperellum* шероховатость увеличивается в большей степени по сравнению с клетками дрожжей. Это может быть связано с изначально более неровной поверхностью этих клеток.

Лимфоциты крови, модифицированные полиэлектролитными пленками и наночастицами благородных металлов

На начальном этапе метод иммобилизации наноматериалов был разработан для одноклеточных грибов, имеющих прочную клеточную стенку. Поэтому далее, для оценки функциональных возможностей метода иммобилизации наноматериалов на поверхности клеток, не имеющих клеточной стенки, мы использовали лимфоциты в качестве объекта для иммобилизации наноматериалов.

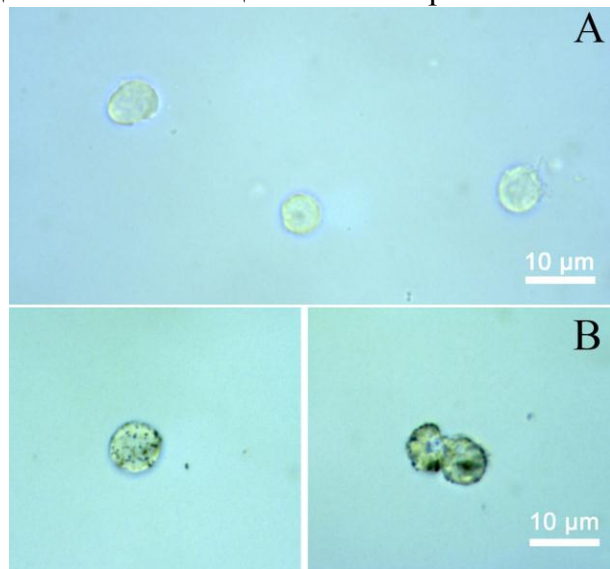


Рис. 6. Типичные оптические микрофотографии intactных лимфоцитов (А) и модифицированных PAN/PSS-AuНЧ (В)

Следует отметить неравномерное распределение НЧ на поверхности лимфоцитов, что можно объяснить двумя причинами: (а) это может быть связано с дискретным значением поверхностного заряда клеток, вследствие чего отрицательно заряженные золотые частицы эффективнее присоединялись к участкам цитоплазматической мембраны, имеющим больший положительный заряд; (б) влияние на электростатическое взаимодействие могли оказать ионы Na^+ и Cl^- , содержащиеся в физиологическом растворе.

Если микроорганизмы имеют толстую клеточную стенку в качестве дополнительного защитного барьера от проникновения НЧ в цитоплазму, то лимфоциты обладают лишь тонкой цитоплазматической мембраной.

В связи с этим, особый интерес представляло изучение распределения и проникновения наночастиц в цитоплазму клеток с применением метода ПЭМ. На ПЭМ-микрофотографиях (Рис. 7D) видно дискретное распределение одиночных наночастиц и их агрегатов, что подтверждает данные СЭМ, но при этом AuНЧ находятся на поверхности и не проникают внутрь клеток, что свидетельствует о способности полиэлектролитных пленок препятствовать проникновению НЧ в цитоплазму.

Лимфоциты выделяли из крови крупного рогатого скота (быка) методом разделения клеток в градиенте фикола (Кондратьева, 2004) (Рис. 6А). Выделенные лимфоциты модифицировали многослойными пленками и AuНЧ, как описано выше (все растворы полиэлектролитов и наночастиц были приготовлены в 0,9% NaCl для предотвращения разрушения клеток).

После покрытия лимфоцитов на оптических микрофотографиях отчетливо видны агрегаты наночастиц на поверхности клеток (Рис. 6В).

Сканирующая электронная микроскопия также показала адсорбцию как единичных наночастиц, так и их агрегатов на поверхности клеток (Рис. 7).

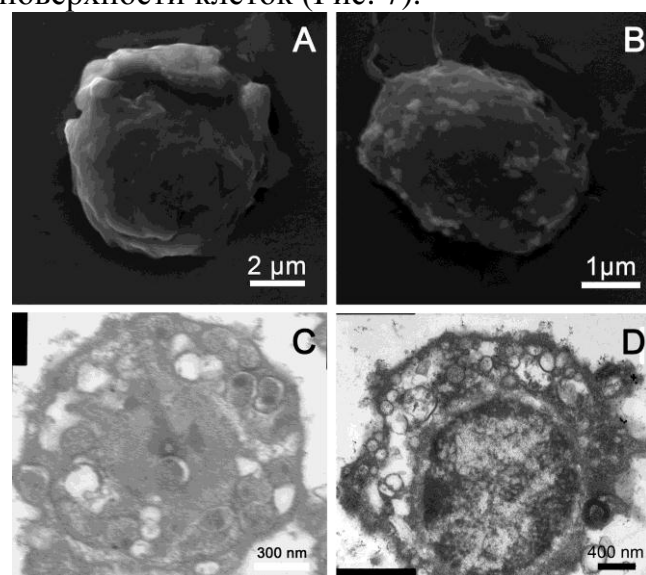


Рис. 7. Типичные СЭМ изображения (А,В) и ПЭМ изображения (С,Д) intactных лимфоцитов крови (А,С) и модифицированных PAN/PSS-AuНЧ (В,Д)

Бактерии *E. coli* и *S. cohnii*, модифицированные полиэлектролитными пленками и наночастицами благородных металлов

Нами были выбраны бактерии, отличающиеся по форме и биохимическому составу клеточной стенки: грамположительный вид - *S. cohnii* и грамотрицательный вид – *E. coli*. Метод иммобилизации наноматериалов на поверхности бактерий осуществлялся аналогично вышеописанной схеме.

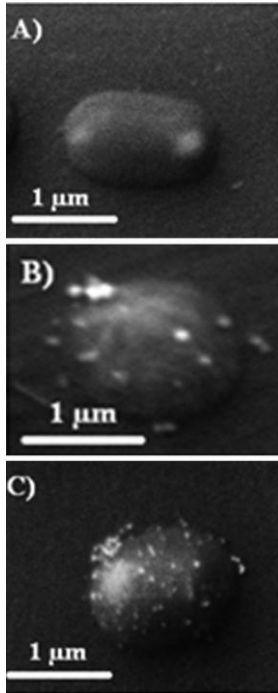


Рис. 8. Типичные СЭМ изображения бактерий *E. coli*: интактная (А); модифицированная PAN/PSS -AgНЧ (В); модифицированная PAN/PSS -AuНЧ (С)

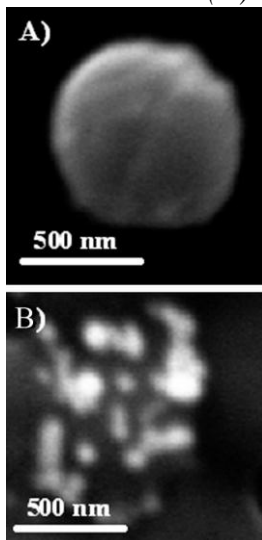


Рис. 9. Типичные СЭМ изображения бактерий *S. cohnii*: интактная (А); модифицированная PAN/PSS-AgНЧ (В)

Плотность и распределение золотых и серебряных наночастиц на поверхности модифицированных клеток далее были изучены с использованием методов СЭМ и АСМ. Изображения бактерий, полученные с помощью СЭМ, показывают наличие единичных наночастиц и их агрегатов на поверхности модифицированных клеток, при этом их равномерность и плотность меняется от клетки к клетке, что может быть связано с наличием специфических участков связывания на бактериальной клеточной стенке (Рис. 8, 9). Необходимо отметить тот факт, что характер покрытия наночастицами поверхности бактерий разных видов *E.coli* и *S. cohnii* различен, что может быть обусловлено различным биохимическим составом клеточной стенки этих бактерий (Рис. 8,9).

Также было отмечено, что внутри одного вида бактерий, золотые и серебряные наночастицы по-разному модифицируют поверхность клеток. При сравнении Рис. 8В и 8С видно, что AgНЧ формируют менее плотный слой на поверхности клеток *E. coli* (по сравнению с AuНЧ). В связи с этим топография поверхности модифицированных бактерий *E. coli* была охарактеризована АСМ.

На Рис. 10 представлена топография поверхности интактной и модифицированной клетки *E. coli*. Установлено, что поверхность интактной бактерии *E. coli* относительно гладкая, ровная, тогда как при модификации наночастицами она меняется, становится шероховатой и неровной, четко виден характер распределения и агрегирования наночастиц, что затруднительно при визуализации с использованием СЭМ. Кроме того, при модификации AgНЧ топографические характеристики клеточной стенки *E. coli* меняются в большей степени по сравнению с AuНЧ, что может быть связано с большими размерами AgНЧ и их агрегатов.

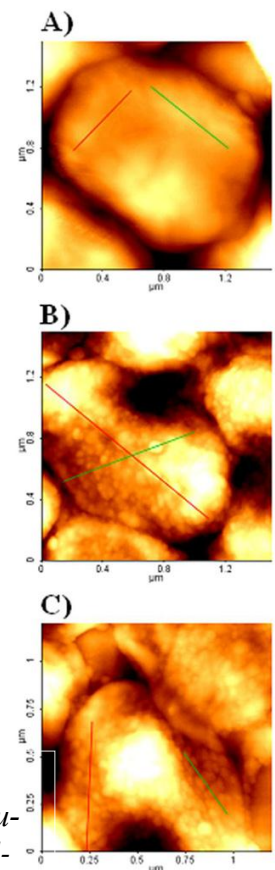


Рис. 10. АСМ-изображения бактерий *E.coli*: интактная клетка (А), модифицированная PAN/PSS-AgНЧ (В) и PAN/PSS-AuНЧ (С). Размер скана – 1x1 мкм

Водоросли *C. pyrenoidosa*, модифицированные полиаллиламином гидрохлорид-стабилизированными МНЧ

Ранее в литературе было описано применение магнитных наночастиц для модификации поверхности водорослей рода *Chlorella* с целью создания нового класса биосорбентов (Safarikova et al., 2008), при этом происходила гибель магнетизированных клеток в процессе иммобилизации. В связи с этим, интересным представилось оценить возможности разработанного нами метода для магнетизации одноклеточных зеленых водорослей *C. pyrenoidosa* и сохранения их жизнеспособности. На данном этапе исследования был применен иной подход для иммобилизации наноматериалов, который заключался в том, что МНЧ в процессе синтеза стабилизировали полиэлектролитом РАН, что приводило к образованию на поверхности НЧ поликатионной пленки (значение ζ -потенциала составило $\sim +48$ мВ). Стабилизированные таким образом МНЧ затем одноэтапно наносили на поверхность клеток *C. pyrenoidosa*.

Одноклеточная водоросль *C. pyrenoidosa* окружена плотной клеточной стенкой и прилегающей к цитоплазме липидной мембраной; цитоплазма содержит хлоропласты, которые придают зеленую окраску клеткам (Рис. 11А). После иммобилизации МНЧ, водоросли приобретают бурую окраску вследствие адсорбции НЧ на поверхность клеток (Рис. 11В).

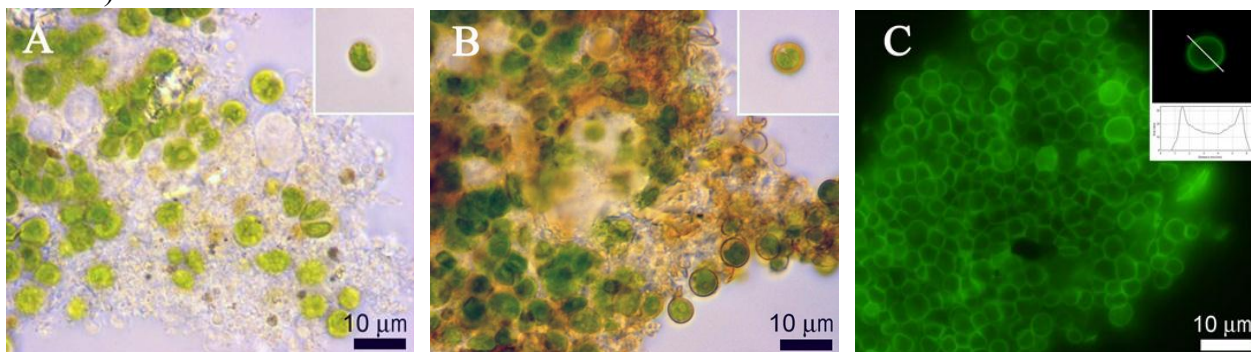


Рис. 11. Типичные оптические микрофотографии водорослей *C. pyrenoidosa*: интактные клетки (А), модифицированные РАН-МНР (В); флуоресцентное изображение клеток, модифицированных FITC-РАН-МНР (С)

Для характеристики структуры полученного покрытия были использованы МНЧ, стабилизированные РАН, меченым поли(флуоресцеин изотиоцианатом) (FITC), которые одноэтапно наносились на поверхность клеток. На Рис. 11С видно, что зеленая флуоресценция FITC-РАН локализована вокруг клеточной стенки, это также подтверждает равномерное покрытие поверхности водорослей МНЧ.

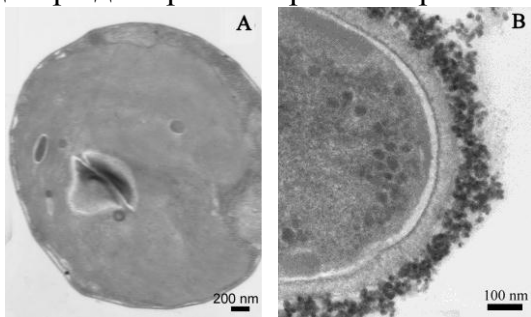


Рис. 12. Типичные ПЭМ-изображения водорослей *C. pyrenoidosa*: интактная клетка (А); модифицированная РАН-МНР (В)

Равномерное распределение МНЧ на поверхности водорослей также было установлено с помощью ПЭМ, при этом толщина нанопленки составила 90 ± 20 нм (Рис. 12). Для характеристики топографии поверхности магнитно-модифицированных водорослей мы применили метод СЭМ, совмещенный с техникой энергодисперсионного рентгеновского анализа (EDX), определяющего элементный состав исследуемого вещества (Рис. 13).

На изображениях модифицированных клеток четко видны МНЧ. Элементный анализ также показал наличие на спектрах, полученных от магнитно-модифицированных водорослей, характерные пики атомов железа, которые отсутствуют на спектрах интактных клеток, что дополнительно демонстрирует эффективное присоединение МНЧ.

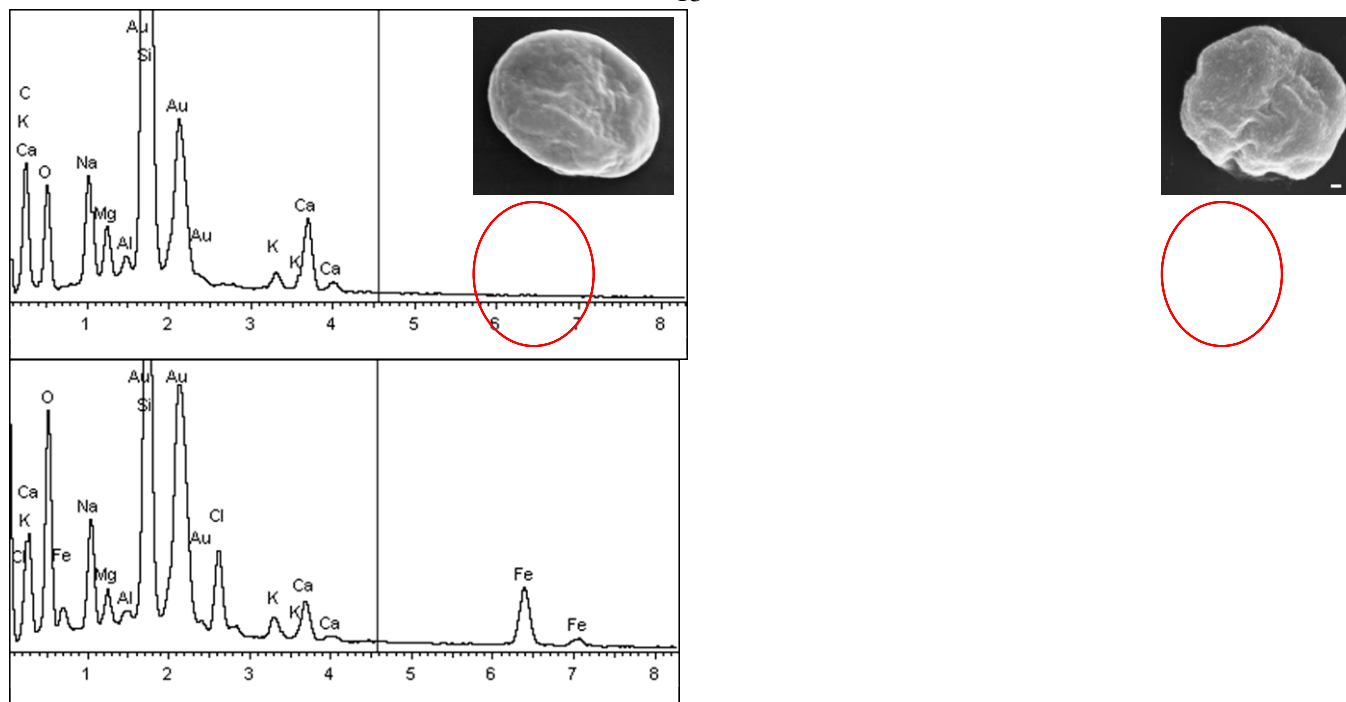


Рис. 13. Типичные СЭМ изображения водорослей *S. pyrenoidosa*: интактная клетка (слева) клетка, модифицированная ПАН-MNP (справа) и соответствующие им спектры энергодисперсионного элементного анализа. Шкала размера – 200 нм

Клетки дрожжей *S. cerevisiae*, модифицированные полиэлектролитными пленками и УНТ

Далее была показана возможность применения анизотропных наноструктур для иммобилизации на поверхности клеток. Анизотропные наноматериалы представляют особый интерес в сравнении с изотропными НЧ (такими, как наносферы благородных металлов и оксида железа). Нами были использованы многостенные УНТ, обладающие уникальными физико-химическими свойствами (Liu et al., 2009), которые используются в биоэлектронике (Gheith et al., 2006), биосенсорах (Zhang et al., 2007) и тканевой инженерии (Jan, Kotov, 2007). УНТ обладают линейными размерами, лежащими в микродиапазоне (>100 нм), тогда как их диаметр не превышает 30-40 нм. Таким образом, нанесение анизотропных наноструктур на поверхность живых клеток может существенно отличаться от нанесения НЧ.

Модификацию поверхности клеток *S. cerevisiae* проводили, как описано выше, при этом в многослойную полиэлектролитную пленку был включен слой предварительно окисленных многостенных УНТ.

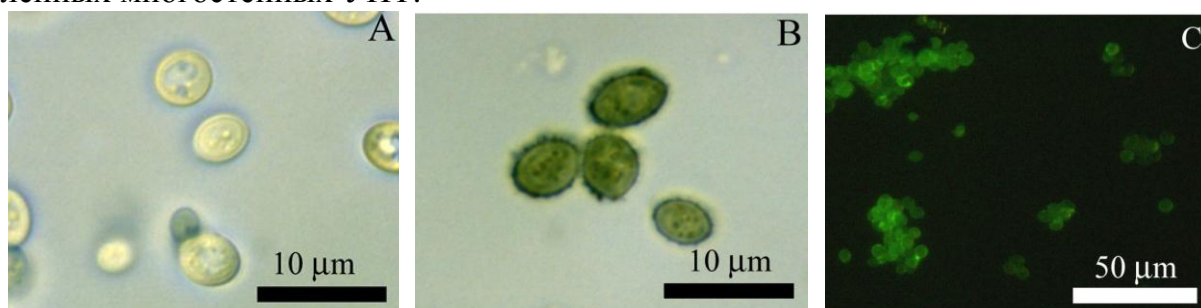


Рис.14. Типичные оптические микрофотографии дрожжей *S. cerevisiae*: интактные (А), модифицированные ПАН/PSS-УНТ (В); флуоресцентное изображение клеток, модифицированных ПАН/PSS/ПАН/УНТ/ FITC-ПАН/PSS (С)

После иммобилизации полиэлектролитов и УНТ, клетки приобретают темно-зеленую окраску, что свидетельствует о включении УНТ в структуру многослойной пленки и формировании плотного слоя покрытия из УНТ на поверхности клеток (Рис. 14В).

Нанотрубки относятся к классу 1-мерных наноструктур, имеющих большие латеральные размеры, в частности, длина используемых нами УНТ достигала несколько сотен нанометров, тогда как толщина пленки PAN/PSS по данным литературы составляет около 1 нм (Veerbadran et al., 2007). В связи с этим, для оценки целостности и равномерности полученного нанопокрывтия, на предпоследнем этапе нанесения вместо PAN мы использовали флуоресцентно-меченый FITC-PAN. Дистальная флуоресценция модифицированных клеток подтверждает формирование многослойной пленки на клеточной стенке (Рис. 14С), при этом видно, что пленка не повреждена УНТ, включенными в состав многослойного покрытия.

Для более детальной характеристики многослойных покрытий были применены методы просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии.

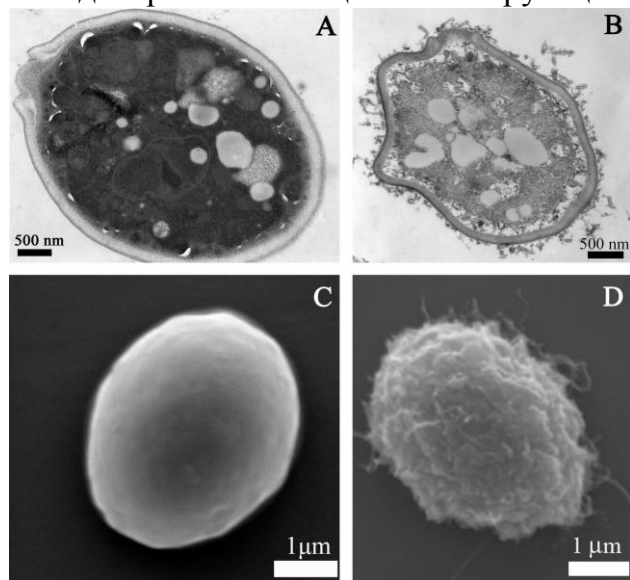


Рис. 15. Типичные ПЭМ изображения (А,В) и СЭМ изображения (С,Д) дрожжей *S. cerevisiae*: интактная клетка (А,С); клетка, модифицированная PAN/PSS-УНТ (В,Д)

На изображениях тонких срезов клеток, полученных с использованием ПЭМ, видно, что изначально гладкая и ровная клеточная стенка дрожжей после модификации полиэлектролитными пленками и УНТ меняется, становится «ворсистой» из-за длинных нитей нанотрубок, иммобилизованных на поверхности клеток (Рис.15). Толщина многослойной пленки, содержащей УНТ, составила в среднем, 80 нм, но также встречались тонкие участки с толщиной 20-30 нм или очень широкие участки в 200 нм, что может быть связано с характером адсорбции УНТ. На поверхности клеток встречаются как единичные УНТ, так и их агрегаты, которые могут образовываться вследствие адсорбции изначально агрегированных нанотрубок, либо в процессе самосборки агрегатов при иммобилизации УНТ на поверхности клеток.

Необходимо отметить, что УНТ ориентированы на поверхности модифицированных клеток хаотично: некоторые из них плотно прилегают к клеточной стенке, другие прикреплены к поверхности только одной стороной и ориентированы наружу, придавая «ворсистый» внешний вид модифицированным клеткам. Эти наблюдения позволяют предположить, что полиэлектролитные многослойные пленки обеспечивают эффективное присоединение УНТ к поверхности клеток, что, однако не мешает проникновению низкомолекулярных молекул внутрь клетки.

Далее структура многослойной пленки, содержащей углеродные нанотрубки, была охарактеризована методом СЭМ. Показано, что иммобилизация УНТ ведет к образованию однородного, равномерного покрытия из нанотрубок и пленок на поверхности дрожжей, что четко видно при сравнении изображений интактных и модифицированных клеток. На Рис. 15 видны длинные нити УНТ, неплотно прилегающих к клеточной стенке, что подтверждается ПЭМ микрофотографиями. Вероятно, что такие неприкрепленные нити УНТ могут служить в качестве микроконтактов между клетками и источником электрического тока в микроэлектронных устройствах.

Изучение жизнеспособности клеток, модифицированных наноматериалами

В связи с необходимостью иммобилизации наноматериалов на поверхности живых клеток, далее была изучена жизнеспособность и физиологическая активность модифицированных клеток. Ранее в литературе было показано, что полиэлектролитные

пленки не влияют на жизнеспособность клеток (Klabunde et al., 2001; Diaspro et al., 2002), а металлические НЧ (Lewinski et al., 2008; Farkas et al., 2010) и УНТ (Isobe et al., 2006) цитотоксичны. Мы полагали, что включение НЧ в структуру многослойной пленки позволит избежать непосредственного контакта НЧ с поверхностными структурами клеток и проникновения в цитоплазму, тем самым жизнеспособность и физиологическая активность модифицированных клеток будет сохранена. Нами была оценена жизнеспособность модифицированных клеток.

В качестве универсального метода оценки жизнеспособности был выбран биохимический метод определения физиологической активности клеток с помощью диацетата флуоресцеина (ФДА), используемый в мировой практике для определения жизнеспособности как прокариотических (Green et al., 2006), так и эукариотических (Afrimzon et al., 2008) организмов. ФДА, гидрофобное нефлуоресцирующее соединение, легко проникает через интактную мембрану в цитоплазму, где подвергается расщеплению внутриклеточными неспецифическими эстеразами с образованием флуоресцеина, обладающего зеленой флуоресценцией (при возбуждении $\lambda=488$ нм) (Breeuwer et al., 1995). Флуоресцеин полярен и не способен проходить через неповрежденные мембраны, вследствие этого вещество аккумулируется только в цитоплазме жизнеспособных клеток с интактной цитоплазматической мембраной. Следовательно, метод позволяет оценить жизнеспособность модифицированных клеток по двум параметрам: по биохимической активности и интактности поверхностных структур модифицированных наноматериалами клеток. Эксперименты проводились при оптимальном значении pH~6,5, необходимом для ферментативного гидролиза диацетата флуоресцеина (Breeuwer et al., 1995).

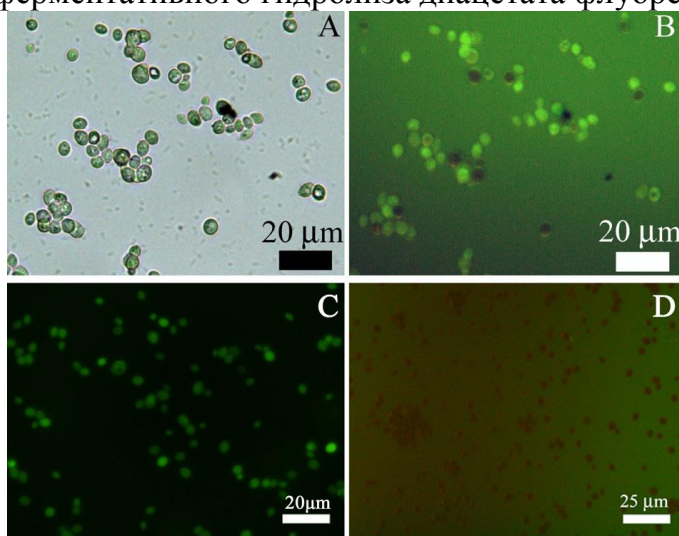


Рис. 16. Типичные микрофотографии дрожжей *S. cerevisiae*: оптическая микрофотография клеток, модифицированных PAN/PSS-УНТ (А) и соответствующее ей флуоресцентное изображение после инкубации клеток с ФДА (В); флуоресцентное изображение живых (С) и мертвых клеток (D), модифицированных PAN/PSS-AuНЧ, после инкубации с ФДА

На Рис. 16 представлены флуоресцентные микрофотографии дрожжей *S. cerevisiae*, модифицированные многослойной полиэлектролитной пленкой, содержащей в своем составе различные наноструктуры (НЧ благородных металлов и УНТ), где отчетливо видно, что вне зависимости от типа используемых наноструктур, модифицированные клетки флуоресцируют зеленым цветом, т.е. являются физиологически активными, в то время как флуоресценция в термически инактивированных клетках (отрицательный контроль) не наблюдается. На оптических микрофотографиях дрожжей, модифицированных УНТ, просматриваются темные пятна агрегатов нанотрубок на поверхности некоторых клеток, которые вызывают ослабление интенсивности флуоресценции, не влияя при этом на жизнеспособность модифицированных клеток.

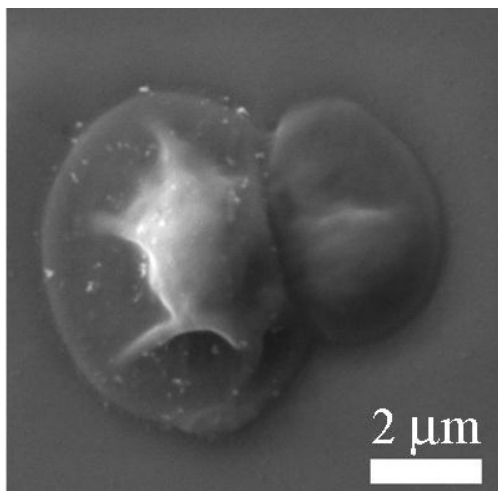


Рис. 17. Типичное СЭМ изображение почкующейся клетки *S. cerevisiae*

Аналогичные результаты были получены и для модифицированных бактерий *E. coli* и *S. cohnii*. Так, после обработки ФДА, в модифицированных AuНЧ клетках *E. coli*, наблюдалась флуоресценция, характерная для физиологически активных клеток с ненарушенной цитоплазматической мембраной (Рис. 18).

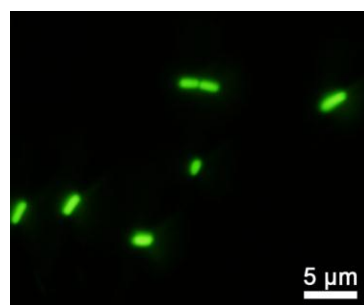


Рис.18. Типичное флуоресцентное изображение клеток *E. coli*, модифицированных PAH/PSS-AuНЧ, после инкубации с ФДА

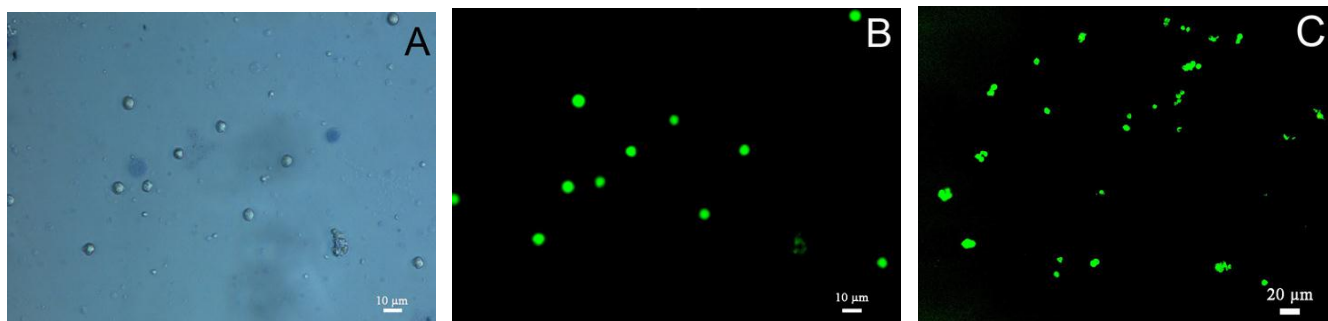


Рис. 19. Типичные оптические микрофотографии интактных лимфоцитов, окрашенных ТС (А); флуоресцентное изображение лимфоцитов, окрашенных ФДА: интактные (В) и модифицированные PAH/PSS-AuНЧ (С)

Жизнеспособность лимфоцитов после выделения определяли окрашиванием трипановым синим (ТС): на Рис. 19 видно, что краситель не аккумулируется в живых клетках. После иммобилизации AuНЧ на поверхности лимфоцитов, модифицированные клетки были повторно окрашены ТС, и мы наблюдали, что все модифицированные клетки окрашивались в синий цвет, характерный для ТС. Мы предположили, что это связано с тем, что ТС является анионным красителем, который при диссоциации в воде приобретает отрицательный заряд, и может связаться с заряженной пленкой, сформированной на поверхности лимфоцитов, что приводит к ложноотрицательному результату. Поэтому жизнеспособность интактных и модифицированных лимфоцитов была изучена с применением ФДА. На рисунках представлена типичная оптическая микрофотография интактных лимфоцитов, окрашенных ТС (Рис. 19А), и соответствующее ей флуоресцентное изображение лимфоцитов, обработанных ФДА (Рис. 19В), при этом в живых лимфоцитах наблюдается характерная зеленая флуоресценция (Рис. 19В). Далее модифицированные нанопленками и AuНЧ лимфоциты были окрашены ФДА, и было показано, что после модификации лимфоциты остаются жизнеспособными (Рис. 19 С).

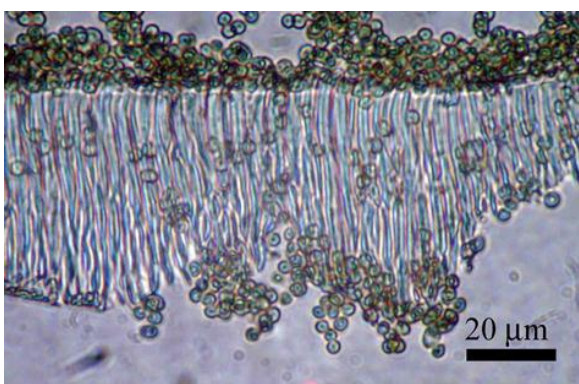


Рис. 20. Оптическая микрофотография конидий, модифицированных PАН/PSS-AgНЧ, формирующих мицелий

Для оценки жизнеспособности конидий *T. asperellum* были исследованы процессы прорастания. Было показано, что модифицированные AgНЧ конидии *T. asperellum* формируют мицелий после 12 часов инкубации при + 37° С (Рис. 20), тогда как в контрольном образце, содержащем интактные конидии, после 12 часов инкубации в суспензии серебряных наночастиц и с последующей инкубацией при + 37°С в 0,01М растворе сахарозы в течение 12 часов, прорастания не наблюдалось.

Жизнеспособность модифицированных МНЧ водорослей *C. pyrenoidosa* изучали методом, основанным на автофлуоресценции водорослей при возбуждении светом с длиной волны 540 нм, что соответствует максимуму поглощения хлорофилла В. Ранее этот тест был разработан и успешно применен для демонстрации жизнеспособности водорослей рода *Chlorella* (Chong et al, 2008).

Клетки *C. pyrenoidosa* модифицировали PАН-стабилизированными МНЧ, инкубировали их в течение 48 часов и определяли влияние МНЧ на клетки водорослей, результаты показаны на Рис. 21. Видно, что в магнитно-модифицированных водорослях, так же как и в интактных, наблюдается красная флуоресценция, что означает отсутствие цитотоксичности у PАН-стабилизированных МНЧ.

Таким образом, было показано, что вне зависимости от типа используемых наноструктур, разработанный нами метод иммобилизации наноматериалов на поверхности клеток не ингибирует жизнеспособность и биохимическую активность модифицированных клеток.

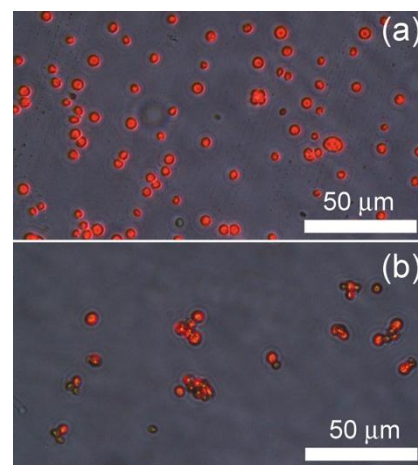


Рис. 21. Флуоресцентное изображение клеток *C. pyrenoidosa*: интактных (а), модифицированных PАН-МНР (b)

Практическое применение метода иммобилизации наноматериалов на поверхности живых клеток

Характеристика клеток, модифицированных полиэлектролитами и НЧ благородных металлов, методом поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии

Одним из практических применений разработанного нами метода служит характеристика и детекция микроорганизмов с помощью поверхностно-усиленной рамановской спектроскопией (ПУРС), в основе которой лежит явление рамановского рассеяния света в веществе, сопровождающееся заметным изменением его частоты, что обусловлено химическим составом исследуемого вещества. При этом в спектре рассеянного излучения появляются спектральные линии, которых нет в спектре возбуждающего света (Otto, 1999). Обычно для изучения сигнала применяют обработку объектов наночастицами (в основном, Au и Ag). Наноразмерные частицы, за счет воздействия поверхностных плазмонов усиливают интенсивность спектра, при этом частицы должны находиться в непосредственном контакте (2-3 нм) с веществом. Стандартно, при работе с микроорганизмами, применяют технику смешивания, что дает неравномерное распределение частиц и большое количество агрегированных клеток (Kahraman et al., 2008).

Разработанный же нами метод позволяет изучить единичные клетки, так как послойное нанесение полиэлектролитных пленок и наночастиц приводит к уменьшению агрегации клеток. Для исследования были выбраны модифицированные клетки бактерий *E. coli* и *S. cohnii*, имеющие важное практическое значение в биотехнологии и медицине. На первом этапе были изучены операционные характеристики метода пробоподготовки для ПУРС. Было показано, что агрегаты клеток дают более интенсивный сигнал рамановского спектра, однако воспроизводимость при этом значительно ниже, чем при использовании единичных клеток, также было установлено, что сигнал ПУРС, полученный от модифицированных клеток, характеризуется высокой воспроизводимостью. Необходимо отметить, что интактные клетки, AuНЧ и AgНЧ и полиэлектролиты имеют слабый сигнал и не оказывают значительного влияния на итоговый сигнал, соответственно спектр ПУРС, полученный от модифицированных бактерий, обусловлен биохимическим составом клеточных стенок.

Для оптимизации процесса иммобилизации нами были опробованы два подхода к модификации поверхности клеток: (1) на поверхность клеток наносили многослойную пленку PАН/PSS/PАН/AgНЧ(AuНЧ)/PАН/PSS, (2) наносили бислойную пленку PАН/AgНЧ(AuНЧ)/PАН. Для оценки эффективности методов сравнивали спектры ПУРС клеток, модифицированных композитными пленками (1 и 2). Из Рис. 22 видно, что спектр клеток *E.coli*, модифицированных как 1, так и 2 способом, содержит характерные для данного микроорганизма пики, тогда как в спектре интактных клеток различимые пики отсутствовали. Однако применение бислойной пленки PАН с включенными в ее состав НЧ благородных металлов позволяет получить более интенсивный сигнал ПУРС, поэтому далее мы использовали второй вариант метода иммобилизации.

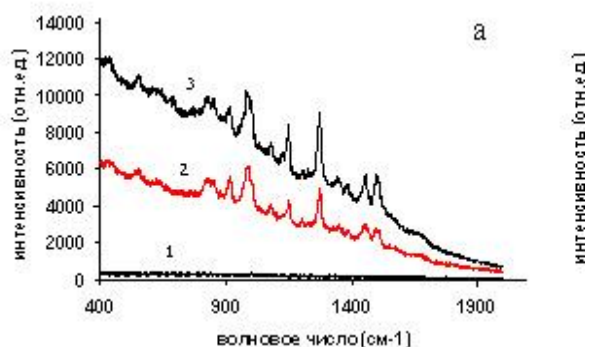


Рис. 22. Спектр ПУРС клеток *E. coli* в зависимости от типа модификации а) PАН/AgНЧ/РАН, б) PАН/PSS/РАН/AgНЧ/РАН/PSS; 1) интактные, 2,3) модифицированные клетки

Известно, что химический состав НЧ влияет на характер спектра ПУРС, в связи с этим, далее нами было изучено влияние AuНЧ и AgНЧ на качество и воспроизводимость спектров модифицированных бактерий.

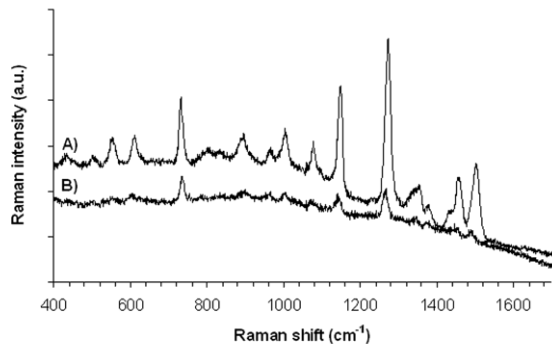


Рис. 23. Спектры ПУРС клеток *S. cohnii*, модифицированных PАН/AgНЧ/РАН (A) и PАН/AuНЧ/РАН (B)

Аналогичные результаты были получены и для бактерий *E. coli*. Таким образом, использование AgНЧ для модификации клеточной стенки бактерий позволяет увеличить эффективность характеристики бактерий методом ПУРС, вследствие чего в дальнейшем бактерии были модифицированы полиэлектролитными пленками и AgНЧ.

На Рис. 24 представлены спектры модифицированных бактерий *E. coli* и *S. cohnii*, которые демонстрируют различия биохимической структуры клеточной стенки исследуемых бактерий, принадлежащих к разным видам. Известно, что *S. cohnii* - грамположительный вид, обладающий толстой клеточной стенкой из многослойного пептидогликана, состоящего из N-ацетилглюкозамина (NAG) и N-ацетилмурамовой кислоты (NAM), тогда как *E. coli* – грамтрицательный вид, особенность клеточной стенки которого заключается в наличии наружной мембраны, состоящей из фосфолипидов, липополисахаридов, липопотеина и белков, под которой расположено периплазматическое пространство, содержащее один слой пептидогликана (Lengeler et al., 2005).

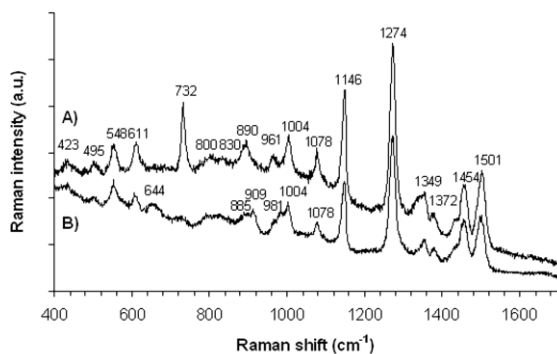


Рис. 24. Спектры ПУРС бактерий *S. cohnii* (A) и *E. coli* (B), модифицированных PАН/AgНЧ/РАН

По интенсивности данного пика можно предположить, что пик 730 см^{-1} обусловлен всеми указанными биохимическими структурами клеточной стенки. ФАД является важным коферментом, участвующим в окислительно-восстановительных реакциях, и локализуется главным образом во внутренней стороне клеточной стенки бактерий (Efrima, Zeiri, 2009). Ранее было показано, что при использовании техники непосредственного смешивания наночастиц с бактериями, AgНЧ проникают в периплазматическое пространство благодаря гибкой структуре клеточной стенки грамтрицательных бактерий

Рамановские спектры модифицированных бактерий *S. cohnii* представлены на Рис. 23. При анализе спектров установлено, что спектральные пики идентичны и воспроизводят друг друга, однако при использовании серебряных наночастиц интенсивность сигнала выше и спектральные пики более четкие, что может быть связано с более интенсивным поверхностно-плазмонным резонансом серебряных наночастиц при волне возбуждения лазера 830 нм.

При анализе спектров ПУРС модифицированных бактерий *E. coli* и *S. cohnii* (Рис. 24) установлено, что основные различия выявляются при волновом числе около 730 см^{-1} . Происхождение этого пика было ранее исследовано двумя группами ученых и было выяснено, он определяется молекулами производных флавинадениндуклеотида (ФАД), NAG и NAM (Zeiri et al, 2004; Jarvis et al, 2004).

и контактируют с производными ФАД, NAG и NAM, вследствие чего наблюдается интенсивный пик при 730 см^{-1} на спектрах ПУРС *E. coli* (Kahraman et al, 2007; Kahraman et al, 2008). Однако в случае применения послойной модификации клеточной стенки пленками и AgНЧ бактерий *E. coli* наблюдается очень слабая интенсивность пика 730 см^{-1} . Возможно, что обработка клеток положительно заряженным полиэлектролитом РАН увеличивает стабильность внешней мембраны *E. coli* и предотвращает доступ наночастиц к определенным участкам бактериальной стенки, где находятся производные ФАД и пептидогликаны. Для сравнения были приготовлены образцы бактерий *E. coli* с использованием двух методов: техникой смешивания и послойной модификацией. Было выявлено наличие слабого пика при 730 см^{-1} в обоих случаях для *E. coli*, тогда как на спектре ПУРС модифицированных бактерий *S. cohnii* присутствовал четкий и интенсивный пик в области 730 см^{-1} .

Исходя из этого, можно сделать два вывода: во-первых, в случае *S. cohnii* пик 730 см^{-1} обусловлен NAG и NAM грамположительной клеточной стенки данного вида, а в случае *E. coli* – обеими биохимическими группами производных ФАД или NAG и NAM грамотрицательной стенки бактерий. Во-вторых, бислойная пленка РАН селективно связывается с определенными, возможно, наиболее отрицательно заряженными участками грамположительной бактериальной клеточной стенки, что объясняет результаты микроскопических исследований неравномерного покрытия клеток *S. cohnii* наночастицами.

По данным литературы, интенсивность и четкость спектров ПУРС, полученных при непосредственном смешивании наночастиц с клеток, обусловлены суммарным биохимическим составом клеток в составе образуемых агрегатов (Jarvis et al, 2008). Разработанный же нами метод модификации поверхности клеток наноматериалами позволяет идентифицировать и характеризовать единичные клетки. При использовании объектива $\times 50$ светового микроскопа, луч лазера фокусируется на клетке благодаря свойству AgНЧ эффективно отражать свет.

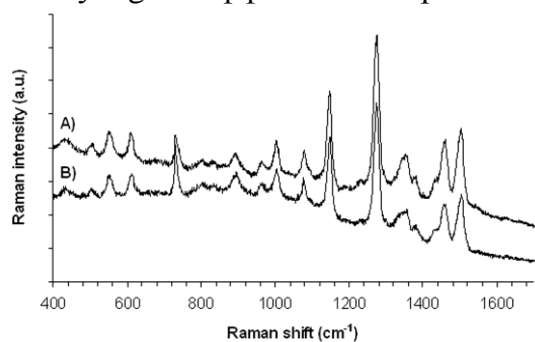


Рис. 25. Спектры ПУРС *S. cohnii*, модифицированных РАН/AgНЧ/РАН: агрегаты (А) и единичные клетки (В)

Интенсивность получаемого сигнала ПУРС ограничена размером пятна образца, облучаемого лазером, но если даже в образце находятся несколько клеток, луч лазера с диаметром 1 мкм может сфокусироваться только на единичной клетке. На Рис. 25 представлены рамановские спектры агрегатов клеток и единичных клеток, модифицированных бислойной пленкой РАН с наночастицами. Видно, что оба спектра идентичны по характерным пикам и отличаются только интенсивностью пиков.

Также установлено, что спектры ПУРС, полученные от модифицированных бактерий, обладают высокой воспроизводимостью. Кроме того, статистический анализ рамановских спектров, полученных от 8 различных бактерий *S. cohnii*, модифицированных AgНЧ, показал, что коэффициент вариации спектров, полученных от модифицированных бактерий, не превышает 10%, что подтверждает воспроизводимость метода.

Таким образом, было показано, что метод модификации клеток многослойными пленками, содержащими наночастицы благородных металлов, в разных вариациях может быть использован для характеристики биохимического состава клеточной стенки микромицетов, бактерий различных видов, а также для определения видовой принадлежности единичных клеток в бактериальной смеси.

Применение

дрожжей, модифицированных полиэлектролитными

пленками и УНТ, в качестве чувствительных элементов электрохимических биосенсоров

На данном этапе работы нами была продемонстрирована возможность применения электрохимических методов для характеристики дрожжей, модифицированных многослойными пленками, содержащими УНТ. Для этой цели регистрировали перенос электрона, используя феррицианид-ион в качестве искусственного акцептора электронов. Подобный подход был ранее успешно применен для быстрого и достоверного определения суммы окисляющихся органических соединений (показатель биохимического потребления кислорода) (Chen, 2008), этанола (Baronian, 2004) формальдегида (Khlupova et al., 2007) и скрининга токсичных соединений (Liu et al., 2009). Для детекции сигнала биосенсора регистрировали кривую окисления-восстановления иона $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ в режиме циклической вольтамперометрии. Участие феррицианида как акцептора электрона в дыхательной цепи микроорганизмов приводит к понижению его концентрации, а значит, и к снижению тока восстановления. При этом образующийся ферроцианид $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ восстанавливается на электроде с регенерацией исходной (активной) формы индикатора. Об эффективности феррицианида как акцептора электронов, а значит, об активности микроорганизмов, можно судить по величине тока восстановления и соотношению пиков на вольтамперограммах.

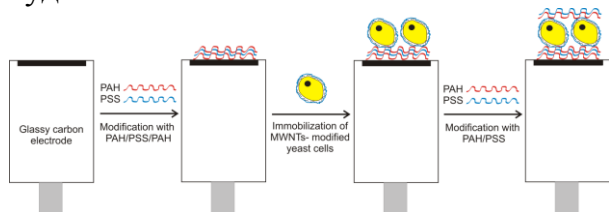
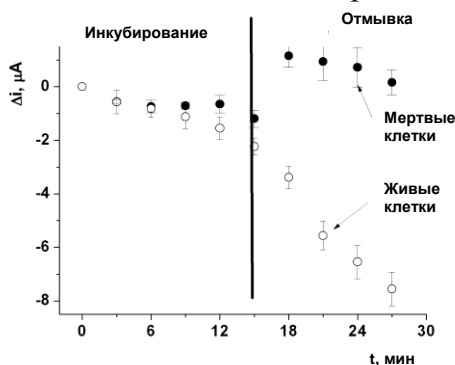


Рис. 26. Схема нанесения клеток на поверхность стеклоуглеродных электродов

Далее в раствор вводили феррицианид-ионы и регистрировали катодную вольтамперограмму. Полученные циклические вольтамперограммы феррицианид-иона на поверхности электрода, покрытого пленкой $(\text{PAH}/\text{PSS})_4$, характерны для квазиобратимого переноса электрона. Об этом говорит симметрия пиков при несколько увеличенной разности потенциалов пика окисления и восстановления (150-180 мВ по сравнению с теоретическим 60 мВ). Величина стандартного редокс-потенциала, определяемая как полусумма потенциалов пика окисления и восстановления, сместилась в сторону несколько меньших анодных значений $E_0 = +200$ мВ отн. Ag/AgCl по сравнению со значением, полученным на непокрытом электроде (+295 мВ). Это может быть связано со ограниченной скоростью переноса электрона через непроводящие слои пленки $(\text{PAH}/\text{PSS})_4$. Линейная зависимость тока в координатах $I - \sqrt{\nu}$ (I - ток пика восстановления феррицианида, мкА, ν - скорость сканирования потенциала, мВ/с) характерна для диффузионного контроля переноса электрона (замедленной стадии переноса индикатора к поверхности электрода). При регистрации нескольких вольтамперограмм из одного раствора индикатора было установлено, что ток пика восстановления значительно увеличивался после первого сканирования и далее оставался постоянным в течение, по крайней мере, 30 мин.



После включения слоя живых интактных клеток в многослойную полимерную пленку ток восстановления $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ значительно уменьшался по сравнению с аналогичным измерением в отсутствие клеток. Это может быть связано с участием $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ в переносе электрона по электрон-транспортной цепи живых клеток. В подтверждение этого, при использовании

Рис. 27. Изменения тока пика восстановления $[Fe(CN)_6]^{3-}$ в зависимости от модификации клеток дрожжей термически инактивированных клеток регистрируемое значение тока незначительно возросло (Рис.27).

Изменение тока пика восстановления феррицианида при переходе от живых к мертвым клеткам составило $2,2 \pm 0,1$ мкА, или 20% от начальной величины тока пика, наблюдаемого для пленки PAN/PSS в отсутствие клеток. Далее были изучены клетки, модифицированные полиэлектролитными пленками PAN/PSS и многостенными углеродными нанотрубками. Морфология вольтамперограмм $[Fe(CN)_6]^{3-}$ на электродах, модифицированных покрытиями, содержащими клетки, и покрытых только пленкой PAN/PSS, была в целом одинакова. Наблюдалась хорошо разрешенная пара редокс-пиков обратимого переноса электрона. При этом значение тока пика восстановления $[Fe(CN)_6]^{3-}$ при внесении в поверхностный слой живых клеток дрожжей, модифицированных УНТ, уменьшался до $9,0 \pm 0,2$ мкА. Для сравнения, в случае иммобилизации УНТ на поверхности мертвых клеток дрожжей он составил $12,0 \pm 0,1$ мкА. Таким образом, изменение тока в экспериментах с живыми и мертвыми клетками, модифицированными многослойными полиэлектролитными пленками, содержащими в своем составе УНТ, была выше, чем для интактных живых и мертвых клеток в тех же условиях измерения сигнала. В то же время, эффективность переноса электрона, на ион индикатора, определяемая как уменьшение тока пика восстановления по сравнению с электродом, модифицированным слоем $(PAN/PSS)_4$, была выше для модифицированных клеток. Возможно, это связано с частичным электростатическим отталкиванием отрицательно заряженных редокс-анионов от УНТ, несущих карбоксильные группы.

Различное поведение модифицированных живых и мертвых клеток также проявлялось на стадии отмывки электродов после измерения. Для контроля стадии отмывки электроды сначала инкубировали в растворе $[Fe(CN)_6]^{3-}$ и далее переносили в 0,5 М NaCl, не содержащий феррицианид-ионов. В обычных условиях токи, отнесенные к восстановлению феррицианид-иона, снижались до нуля в течение 10 мин, что свидетельствовало о быстром высвобождении феррицианида из поверхностного слоя. Однако для электродов, покрытых модифицированными клетками, было обнаружено первоначальное увеличение тока восстановления на 15% от начального значения. Далее, различия в сигналах электродов, покрытых живыми и мертвыми модифицированными клетками, в течение 3 минут отмывки достигали 50% от начального значения. Это является вполне достаточным признаком для распознавания живых и мертвых клеток, включенных в полимерные слои. Мы предполагаем, что полученные результаты могут быть использованы в создании респираторных микробных сенсоров или в антимикробных тестах для увеличения чувствительности определения антимикробной активности препаратов или оценки показателей жизнеспособности клеток.

Перспективы практического применения одноклеточных водорослей, модифицированных магнитными наночастицами

Разработанный метод иммобилизации МНЧ на поверхности живых клеток водорослей может быть применен для пространственной манипуляции магнитно-модифицированными клетками с помощью постоянного внешнего магнитного поля. Это открывает новые возможности для применения таких магнетизированных водорослей при создании микрофлюидных устройств, микроканальных биосенсоров, а также искусственных фотосинтетических ячеек.

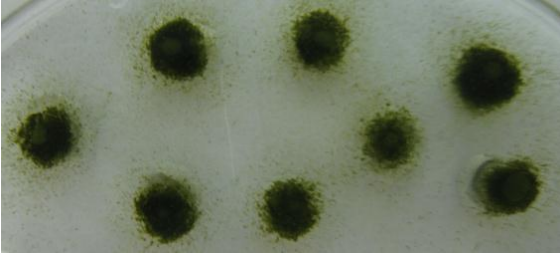


Рис. 28. Фотография, иллюстрирующая процесс микроstructuring МНЧ-модифицированных водорослей

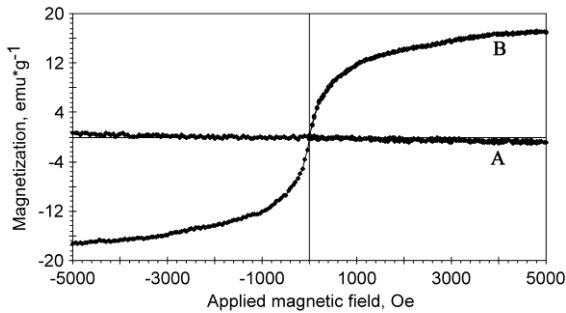


Рис. 29. Изотермические кривые магнетизации водорослей *C. pyrenoidosa*: интактных (А) и МНЧ-модифицированных (В) клеток

В качестве одного из возможных практических применений мы предлагаем микроstructuring клеток, ассоциированных вокруг магнитов. Так, магнетизированные водоросли *C. pyrenoidosa* можно расположить в определенном порядке на поверхности стекла при помощи небольших магнитов с диаметром ~ 2 мм, находящихся под стеклом, как показано на Рис. 28. Мы полагаем, что подобную технику можно применить для непосредственного нанесения магнетизированных клеток на микроканалы или микроэлектроды, оснащенные микромагнитами, для создания оптических или электрохимических биосенсоров.

Магнитное поведение РАН-МНЧ модифицированных водорослей *C. pyrenoidosa* было изучено с применением коэрцитивного спектрометра, где в качестве контроля использовали интактные водоросли *C. pyrenoidosa*. На Рис. 29 показано, что магнетизированные клетки *C. pyrenoidosa* обладают суперпарамагнитными свойствами, тогда как интактные водоросли не проявляют магнитных свойств.

Характер кривой магнетизации позволяет предположить, что клетки *C. pyrenoidosa*, модифицированные РАН-стабилизированными МНЧ, будут проявлять магнитные свойства только при их помещении во внешнее магнитное поле. Это позволяет использовать МНЧ-модифицированные клетки *C. pyrenoidosa* как чувствительный элемент биосенсоров, которые будут обладать преимуществами многократного использования. Кроме того, МНЧ-модифицированные водоросли могут использоваться в других биотехнологических приложениях благодаря широкому спектру ферментативной активности клеток.

ВЫВОДЫ

1. Разработанный метод иммобилизации наноматериалов путем их включения в состав биосовместимых полиэлектролитных многослойных пленок позволяет эффективно присоединить сферические наночастицы и углеродные нанотрубки к поверхности прокариотических и эукариотических клеток.
2. Об эффективности иммобилизации наноматериалов на поверхности клеток свидетельствуют результаты исследования поверхности модифицированных клеток методами сканирующей электронной микроскопии, атомно-силовой микроскопии, спектрометрии энергетической дисперсии. Методом просвечивающей электронной микроскопии на тонких срезах модифицированных клеток показано наличие слоя наночастиц на поверхности клеток и отсутствие их в цитоплазме.
3. После покрытия клеток полимерными пленками и наночастицами дрожжи *S. cerevisiae* сохраняют способность к почкованию, конидии *T. asperellum* сохраняют способность к прорастанию и формированию мицелия, одноклеточные водоросли *C. pyrenoidosa* сохраняют способность к фотосинтезу. У всех исследованных клеток сохраняется эстеразная активность и целостность цитоплазматических мембран.
4. Разработанный метод позволяет иммобилизовать наноматериалы на поверхности клеток и модифицировать клетки эукариот и прокариот наноматериалами и полимерными пленками с целью их последующего использования в идентификации микроорганизмов методом поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии (наночастицы благородных металлов), разработке электрохимических клеточных биосенсоров (углеродные нанотрубки) и применении магнитно-модифицированных клеток в микроаналитических устройствах (магнитные наночастицы).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации по теме диссертации в журналах, рекомендованных ВАК:

1. Zamaleeva, A. I. Polyelectrolyte-mediated assembly of multi-walled carbon nanotubes on living yeast cells / A. I. Zamaleeva, I. R. Sharipova, A. V. Porfireva, G. A. Evtugyn, R. F. Fakhrullin // *Langmuir*. – 2010. – V. 26. – P. 2671-2679.
2. Fakhrullin, R. F. Interfacing living unicellular algae cells with biocompatible polyelectrolyte-stabilised magnetic nanoparticles / R. F. Fakhrullin, L. V. Shlykova, A. I. Zamaleeva, D. K. Nurgaliev, Y. N. Osin, J. Garcia-Alonso, V. N. Paunov // *Macromol. Biosci.* – 2010. – V. 10. – DOI: 10.1002/mabi.201000161
3. Замалеева, А.И. Микроскопические методы для характеристики наномодифицированных клеток микромицетов / А.И. Замалеева, Ф.К. Алимова, Д.Г. Ишмухаметова, Р.Ф. Фахруллин // *Ученые записки Казанского государственного университета*. – 2010. – Т. 152. Серия «Естественные науки». – С. 110 – 120.
4. Fakhrullin, R.F. Living fungi cells encapsulated in polyelectrolyte shells doped with metal nanoparticles / R.F. Fakhrullin, A.I. Zamaleeva, M.V. Morozov, D.I. Tazetdinova, F.K. Alimova, A.K. Hilmutdinov, R.I. Zhdanov, M. Kahraman, M. Culha // *Langmuir*. – 2009. – V. 25. – P. 4628-4634.
5. Замалеева, А.И. Наномодифицированные бактерии: детекция единичных клеток методом поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии / А.И. Замалеева, М. Kahraman, M. Culha, Р.Ф. Фахруллин // *Ученые записки Казанского государственного университета*. – 2009. – Т. 151. Серия «Физико-математические науки». – С. 82-89.
6. Kahraman, M. Layer-by-layer coating of bacteria with noble metal nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering / M. Kahraman, A. I. Zamaleeva, R. F. Fakhrullin, M. Culha // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2009. – V. 395. – P.2559-2567.
7. Fakhrullin, R.F. Quartz crystal microbalance immunosensor for the detection of antibodies to double-stranded DNA / R.F. Fakhrullin, V.G. Vinter, A.I. Zamaleeva, M.V. Matveeva, R.A. Kourbanov, B.K. Temesgen, D.G. Ishmuchametova, Z.I. Abramova, O.A. Konovalova, M.K. Salakhov // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2007. – V. 388. – P. 367-375.

Патенты:

8. Замалеева, А.И. Способ модификации живой клетки / А.И. Замалеева, Ф.К. Алимова, Р.Ф. Фахруллин // Патент РФ № 2377310. – 2009. – Бюл.№36.

Тезисы докладов и материалов конференций:

9. Замалеева, А.И. Иммобилизация наноматериалов на поверхности клеток и их характеристика методами микроскопии / А.И. Замалеева, И.Р. Шарипова, Л.В. Шлыкова, М. Kahraman, М. Çulha, Р.Ф. Фахруллин // IV Международная конференция “Современные достижения бионаноскопии”. Сб. тезисов. – Москва. – 2010. – С.26.
10. Замалеева, А.И. Наномодифицированные микроорганизмы: нанесение полимерных оболочек и наночастиц на поверхность клеточных стенок / А.И. Замалеева, И.Р. Шарипова, Р.Ф. Фахруллин// XIII Международная конференция молодых ученых, студентов и аспирантов «Синтез, исследование свойств, модификация и переработка высокомолекулярных соединений – V Кирпичниковские чтения». Сб. тезисов. – Казань. – 2009. – С. 342.
11. Zamaleeva, A. I. Encapsulation of individual living cells in polymer shells doped with inorganic nanoparticles and microparticles / A. I. Zamaleeva, R. T. Minullina, R. F. Fakhrullin, M. Culha, M. Kahraman, F. K. Alimova, J. Garcia-Alonso, V.N. Paunov // IV UK Polymer Colloids Forum. Abstract book. – Hull. – 2009. – P. 17.
12. Замалеева, А.И. Инкапсуляция живых клеток в полиэлектролитные нанопленки, содержащие металлические наночастицы и углеродные нанотрубки / А.И. Замалеева, И.Р. Шарипова, Р.Ф. Фахруллин // Всероссийская конференция с элементами научной школы для молодежи «Структура и динамика молекулярных систем». Сб. тезисов – Казань. – 2009. – С.24.
13. Zamaleeva, A.I. Encapsulation of individual living cells in polyelectrolyte shells doped with inorganic nanoparticles and carbon nanotubes / A.I. Zamaleeva, R.F. Fakhrullin // 13th annual symposium for biology students of Europe «SymBioSE 2009» «Biology: Expansion of Borders». Abstract book. – Kazan. – 2009. – P. 97.
14. Минуллина, Р.Т. Модификации живых клеток полиэлектролитными нанопленками и металлическими наночастицами / Р.Т. Минуллина, **А.И. Замалеева**, Р.Ф. Фахруллин // Всероссийская школа-семинар для студентов, аспирантов и молодых ученых «Нанотехнологии: проблемы и перспективы». Сб. тезисов. – Белгород. – 2008. – С. 95-97.
15. Замалеева, А.И. Поверхностная структура клеток дрожжей, покрытых полимерными тонкими пленками и золотыми наночастицами / А.И. Замалеева, Д.И. Тазетдинова, М.В. Морозов, Ф.К. Алимova, А.Х. Гильмутдинов, Р.Ф. Фахруллин // II Международная конференция “Современные достижения бионаноскопии”. Сб. тезисов. – Москва. – 2008. – С.26.
16. Fakhrullin, R.F. Anisotropic microcapsules coated with metal nanoparticles / R.F. Fakhrullin, **A.I.Zamaleeva**, Z.I. Abramova, V.N. Paunov // II Saint-Petersburg international conference of NanoBioTechnologies “NanoBio’08”. Book of abstracts. – S.-Petersburg. – 2008. – P.65.
17. Коннова, С.А. Микросферы и микрокристаллы, содержащие металлические наночастицы / С.А. Коннова, Р.Х. Хакимова, **А.И. Замалеева**, Р.Ф. Фахруллин // II Международная научно-практическая конференция «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии». Материалы конф. – Казань. – 2008. – С. 55.
18. Мамаков, Т.В. Микрокристаллы и микросферы с магнитными свойствами /Т.В. Мамаков, А.Г. Бикмуллин, **А.И. Замалеева**, Р.Ф. Фахруллин //III Международная конференция «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии». Материалы конф. – Казань. – 2008. – С. 77.
19. Минуллина, Р.Т. Модификация живых клеток неорганическими микросферами и металлическими наночастицами / Р.Т. Минуллина, Р.К. Вафина, **А.И. Замалеева**, Р.Ф. Фахруллин // II Международная научно-практическая конференция «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии». Материалы конф. – Казань. – 2008. – С. 85.
20. Замалеева, А.И. Модификация микроорганизмов наночастицами для их детекции методом поверхностно-усиленной Рамановской спектроскопии / А.И. Замалеева, М. Kahraman, М. Çulha, Р.Ф. Фахруллин // XXII Международная молодежная научная школа «Когерентная оптика и оптическая спектроскопия». Сб. статей. – 2008. – С. 157-160.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность доц. М. Culha, М. Kahraman и коллективу центра нанотехнологий университета Yeditepe (Стамбул, Турция) за техническую помощь при работе с системой рамановской микроспектроскопии, Ю.Н. Осину и К. Tatlidil за техническую помощь при работе с СЭМ, д.б.н. В.В. Сальникову и А. Lowry за техническую помощь при работе с ПЭМ, проф. Ф.К. Алимовой и коллективу лаборатории сельскохозяйственной биохимии и биотехнологии каф. биохимии за предоставление культуры *T. asperellum*, проф. университета г. Халл В.Н. Паунову (Великобритания) за предоставление химических реактивов, проф. А.П. Киясову за предоставление возможности работы на микроскопах на базе каф. анатомии КГМУ, проф. А.Х. Гильмутдинову и М.В. Морозову за предоставление возможности работы на атомно-силовом микроскопе, проф. Г. А. Евтюгину за помощь в проведении электрохимических исследований, проф. Д. К. Нургалиеву за помощь в проведении магнитометрических исследований, инж. В.С. Гаврилову за квалифицированную техническую помощь, проф. Д.М. Зубаирову, проф. Г.Ф. Ситдиковой и к.б.н. А.В. Яковлеву за консультации при написании диссертации, а также лаборатории биоматериалов и наноматериалов и всему коллективу кафедры биохимии КФУ.

Искреннюю благодарность и признательность автор выражает научному руководителю проф. Диляре Галимовне Ишмухаметовой и научному консультанту к.б.н. Равилю Фаридовичу Фахруллину за руководство работой, помощь в выполнении исследований и моральную поддержку при написании диссертации.

Автор также благодарит семью - папу, маму, сестру, своих родных и близких за любовь и постоянную поддержку.

Отзывы на автореферат просьба отправлять по адресу 420008, Казань, ул. Кремлевская, д.18, КФУ, Отдел аттестации научных кадров, Диссертационный совет Д 212.081.08, Ученому секретарю З.И. Абрамовой, факс: (843)238-76-01

С авторефератом диссертации также можно ознакомиться на сайте КФУ
<http://www.ksu.ru/uni/sank/index.php?id=7>